

Varicella zoster és influenzavírus vakcinák alkalmazásának néhány fontos szempontja

Doktori tézisek

Dr. Sarkadi Júlia

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Gönczöl Éva, DSc, tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Minárovits János, DSc, egyetemi tanár

Dr. Varga Marina, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Anderlik Piroska, PhD, professzor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Rozgonyi Ferenc, DSc, professzor emeritus

Dr. Rusvai Miklós, DSc, egyetemi tanár

Budapest
2017

Bevezetés

A fertőző betegségek megelőzésének leghatékonyabb módja a vakcináció. A jelenleg forgalomban lévő vakcinák biztonságosak és hatásosak, azonban sem a biztonságosságuk sem a hatásosságuk nem tökéletes.

A védőoltások hatását befolyásoló tényezők közül megvizsgáltuk a különböző vakcinációs utak immunválaszt befolyásoló hatását. A parenterális vakcinációs utak közül leggyakrabban a szubkután (s.c.) és intramuszkuláris (i.m.) módot alkalmazzák. Azonban számos vizsgálatban az intradermális (i.d.) alkalmazási mód hatékonyabbnak bizonyult, illetve alacsonyabb antigén dózis mellett is azonos erősségű immunválaszt váltott ki, mint az i.m. vagy s.c. oltás. Vizsgálatainkhoz az élő attenuált vírust tartalmazó *varicella zoster* vírus vakcinát (VZV vakcina, Varilrix, GlaxoSmithKline PLC, UK) választottuk. A *varicella zoster* vírusra jellemző az elsődleges fertőzést követően az érző idegsejtek hátsó gyöki ganglionjaiban kialakuló látencia. Ekkor a vírus a fertőzött sejtben jelen van, de nem replikálódik. A látens vírus reaktiválódhat, melynek következtében beindul a replikációs ciklus és kialakul a *zoster* megbetegedés. *In vitro* a vírus replikációja során kevés infektív partikula keletkezik. Ennek oka, hogy az összeépült vírus burok mannóz-6-foszfát csoportokat is tartalmaz, mely mannóz-6-foszfát receptor tartalmú membránnal rendelkező, késői endoszómához köti a vírust. Az endoszómában létrejött savas közegben a vírusok nagy része degradálódik, infektivitását elveszti. Ez az oka annak, hogy a vírus szaporításához használt sejtenyészet felülúszójában a defektív vírus: infektív vírus arány $10^4:1$. A *herpes zoster* megelőzésére a *zoster* vakcinát először 2006-ban az USA-ban engedélyezték a 60 évnél idősebbek oltására. Ez a vakcina szintén élő attenuált vOKA törzset tartalmaz, de a *varicella* vakcinához képest 14-szeres dózisban. Immunkomprimált személyeknél az élő vírus tartalmú vakcinák kockázatot jelenthetnek.

A védőoltások hatását befolyásoló további tényező a vakcina antigenitása és a természetes fertőzésben játszott patogenetikai szerepe. Vírusfertőzések elleni védelemhez elegendő lehet annak a membránantigénnek a szervezetbe juttatása, amellyel a vírus a célsejtjeihez kötődik, például influenzavírus hemagglutinin (HA) fehérje az aleggység vakcinában. Ez a megállapítás azonban csak HA-homológ influenza törzssel történt újrafertőzés esetén igaz. Nem pontosan ismert, hogy van-e védelem, az milyen fokú és milyen mechanizmus szerint történik HA szempontjából heterológ

vírustörzssel történt fertőződés esetén. A szezonális, trivalens, inaktivált, teljes virionokat tartalmazó, alumínium-foszfáttal adjuvált influenza vakcinával (Fluval AB, Omninvest Kft., Magyarország) végzett kísérleteink a HA, neuraminidáz (NA) és neutralizáló (VN) epitópok szempontjából heterológ vírustörzssel szembeni védelem lehetőségeit vizsgálja. Az influenza megbetegedés elleni védelemben elsődleges szerepük van a HA- és NA- fehérjék működését gátló hemagglutináció gátló (HAG) és neuraminidáz gátló (NAG) ellenanyagoknak, azonban ez a két fehérje tartalmazza a vírus legváltozékonyabb részeit. A változás következménye lehet, hogy az eredeti antigén variáció ellen termelődött HA- és NA- elleni ellenanyagok már nem ismerik fel a vírust, így nem tudják megakadályozni a betegség kialakulását. A HA- és NA- fehérjék konzervatív régiókat is tartalmaznak, de a változékony fehérje szakaszok jelenlétében ezek szerepe sokkal kisebb a védelemben. Ugyanígy a vírus konzervatív, belső fehérjéivel szemben termelődő ellenanyagok is háttérbe szorulnak a HAG és NAG mellett. A konzervatív fehérjékkel szembeni ellenanyagok azonban képesek keresztreakcióra és így keresztvédelmet biztosíthatnak a különböző influenza szubtypusok között is, melyekre a HAG- és NAG- ellenanyagok nem alkalmasak.

Célkitűzések

Kutatómunkánk célja az volt, hogy a VZV- és influenzavírus-vakcinák hatásosságának és biztonságosságának növelésére javaslatokat tegyünk. Munkánk során az alábbi hipotéziseket kívántuk megvizsgálni:

1. Az immunválasz hatékonysága inaktivált VZV-vakcina estében növelhető intradermális oltási mód alkalmazásával.
2. Az influenza megbetegedés elleni humorális védelem elérhető az elsődleges fontosságúnak tartott vírus epitópok elleni antitestek (HAG, NAG, VN) hiányában is.
3. Fluval AB-vakcinációt követően celluláris immunválasz is kialakul, a humorális immunválasz mellett.

Módszerek

1. VZV-vakcináció immunológiai hatása intradermális alkalmazás esetén

1.1. Kísérleti állatok

Kísérleteink során összesen 60 db, 6-8 hetes nőstény Hartley tengerimalacot (LAB-ÁLL Bt., Budapest, Magyarország) használtunk. A kísérleteket az állatvédelmi törvények betartásával és az etikai bizottsági engedélyek birtokában végeztük.

1.2. Vakcinák és alkalmazási módjaik

Az állatok immunizálásához MRC-5 humán diploid sejtvonalon (MRC-5) szaporított Varilrix VZV-vakcinát (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium) használtuk. Az immunizáció során 1/5 (399-PFU) vagy teljes (1995-PFU) humán dózist használtunk élő vagy hővel inaktivált formában, melyet i.d.- vagy s.c.-úton alkalmaztunk. A s.c.-oltáshoz megfelelő oltótűt, míg az i.d.-oltáshoz tűmentes belövő készüléket használtunk, melyet Dr. Jankovics István fejlesztett ki (OEK, Virologiai Főosztály, Nemzeti Influenza Referencia Laboratórium).

1.3. Az intradermális oltáshoz használt készülék megfelelő működésének ellenőrzése

13 db tengerimalacot oltottunk 0,1 ml (399-PFU) élő és 11 db állatot ugyan olyan mennyiségű hővel inaktivált vakcinával. Az oltást követő 0., 2., 4., 7. és 14. napon az oltás helyén bőrbiopszia mintákat vettünk, időpontonként és csoportonként 2-3 állattól.

1.3.1. DNS-izolálás

A bőrbiopszia mintákat dörzsmozsárban folyékony nitrogén és pisztillus használatával homogenizáltuk, majd RLT-Plus puffer (Allprep DNA/RNA kit; Qiagen) és vortex használatát követően, centrifugáltuk. A DNS izolálás a felülúszóból Allprep DNA/RNA kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) használatával történt.

1.3.2. VZV-DNS detektálása qPCR-módszerrel

A qPCR-reakció kivitelezéséhez a VZV-DNS ORF 29-es, valamint az RNázP referenciagén egy szakaszát kódoló nukleotid szekvenciákat és a LightCycler 480 Probes Master kitet (Roche, Mannheim, Germany) használtuk. Az adatok elemzését a LightCycler 480 II rendszerrel végeztettük. Az eredmények számolásánál a komparatív Ct módszert alkalmaztuk. A VZV-DNS tartalom emelkedését az adott időpontban vett mintákban a 0. időponthoz képest adtuk meg.

1.4. Immunválasz mérése különböző VZV-vakcinák alkalmazását követően

Csoportonként 4-6 állatot immunizáltunk az élő gyengített vagy inaktivált formájú oltóanyag 399- vagy 1995-PFU-dózisával i.d.- vagy s.c.-módon. Oltatlan állatokat használtunk kontrollként. Négy héttel a vakcinációt követően az állatokat altatással eutanáziában részesítettük, majd vér és lép mintákat vettünk, kivéve 6 állatot, melyek

az inaktivált vakcina 399-PFU dózisát kapták i.d.-módon, majd 23 héttel később ismételt oltást.

1.4.1. VZV-antigén előállítása és lépsejtek stimulálása

A lépsejtek stimulálásához használt antigén előállításához tengerimalac embrió fibroblaszt sejtjeit az élő gyengített vírus tartalmú vakcinával fertőztük. A fertőzést követő 5. napon a szövetet lekapartuk, jeges vízben történt hűtés közben, ultrahang segítségével feltártuk, majd a centrifugálást követően keletkezett felülúszóval 24 órán keresztül stimuláltuk a lépsejteket.

1.4.2. RNS-izolálás és reverz-transzkripció

A stimulált lépsejtekből a totál RNS-t RNeasy Plus kit, valamint az RNase-Free DNase kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk, majd mRNS-ből cDNS-t a Transcriptor First Strand cDNA synthesis kitet (Roche, Mannheim, Germany) használva szintetizáltunk.

1.4.3. IFN- γ -, granzyme B- és perforin-mRNS kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel

A PCR során az IFN- γ , granzyme B, perforin, valamint referenciaként az RNázP cDNS-ek egy szakaszát kódoló nukleotid szekvenciákat és a LightCycler 480 Probes Master kitet (Roche, Mannheim, Germany), továbbá a LightCycler 480 II készüléket használtuk. Az adott target (IFN- γ , granzyme B, perforin) mRNS kifejeződésének emelkedését az immunizált állatból származó mintákban az immunizálatlan állatból származó mintához képest adtuk meg.

1.4.4. IFN- γ -fehérje koncentráció mérése stimulált lépsejtek felülúszójában ELISA-módszerrel, korreláció az IFN- γ -mRNS kifejeződés és az IFN- γ -fehérje szint között

A stimulált lépsejtek felülúszójában az IFN- γ -fehérje szintet ELISA kit (Guinea Interferon γ ELISA kit; BlueGene Biotech, Shanghai, China) használatával mértük. Pearson módszerrel meghatároztuk a korrelációt a reaktívnak tekintett mintákban kifejeződött IFN- γ -mRNS és a lépsejtek felülúszójában mérhető IFN- γ -fehérje szint között.

1.4.5. VZV-specifikus ellenanyagok mérése az immunizált állatok savójában, VZV-glikoprotein-specifikus ELISA- és vírusneutralizációs-módszerrel

Csoportonként 4-6 állat különböző hígítású savójában határoztuk meg a VZV glikoprotein-specifikus IgG-ellenanyag szintet. A vizsgálathoz nagy tisztaságú VZV-glikoproteinnel fedett ELISA-lemezt (EUROIMMUN anti-VZV glycoprotein ELISA

kit; EUROIMMUN Ag, Lübeck, Germany), horseradish peroxidázzal konjugált-anti tengerimalac IgG-ellenanyagot (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) és tetrametilbenzidin-H₂O₂-szubsztrátot használtunk.

A neutralizáló ellenanyagszint meghatározása plakk-redukciós neutralizációs próbával történt. A vizsgálat megkezdése előtt a tengerimalac savókat MRC-5-sejtekkel kimerítettük, az MRC-5-sejtek elleni ellenanyagok mérésének elkerülése érdekében. A kimerített tengerimalac savókból hígítási sort készítettünk, majd komplement jelenlétében azonos térfogatú, 45-50 PFU infektív vírust tartalmazó VZV-vakcina hígítással összekevertük és 37°C-on 1 órán át inkubáltuk. Az inkubációt követően az ellenanyag-vírus keveréket MRC-5-sejt monolayer-t tartalmazó 8-lyukú szövettenyésztő lemezekre (Asahi Glass Co. Ltd., Tokyo, Japan) pipettáztuk. Az 5. napon IF-módszerrel, VZV-nukleokapszid specifikus egér monoklonális- (Anti-VZV / Varicella Zoster Virus Antibody LS-C76850, Lifespan Biosciences, USA), valamint FITC-jelzett anti-egér ellenanyag (Bartels VRK Anti-Mouse IgG F(ab')₂ FITC Conjugate B1029-86B, Trinity Biotech, USA) használatával megszámláltuk a képződött plakkokat. Ellenanyag titerként a savónak azt a legnagyobb reciprok hígítási értékét tekintettük, amely a plakkok számát 50%-kal csökkentette.

1.5. Statisztikai elemzések

Minden statisztikai számítást a Microsoft Excel 2007 rendszerrel végeztünk. Az eredmények közötti eltérések, szignifikanciák számolásához Mann-Whitney tesztet, a korrelációs koefficiens meghatározásához Pearson tesztet használtunk.

2. Influenza vakcináció védő hatása hemagglutinin és neuraminidáz szempontjából heterológ vírustörzssel végzett fertőzéssel szemben; celluláris és humorális immunválaszok

2.1. Kísérleti állatok

Nőstény 6-8 hetes nem beltenyésztett NMRI (Országos Epidemiológiai Központ, Budapest) és beltenyésztett Balb/c (Charles River Research Models and Services, Germany GmbH) egereket használtunk a kísérletekhez.

2.2. Alkalmazott vakcinák és vírusok

Az immunizációhoz a Fluval AB- (2014/2015) vakcina (Omninvest Kft., Magyarország) három vírustörzsének a H1N1 A/California/07/2009 szerű NYMC X-179A reasszortáns törzs (min. 15 µg HA); H3N2 A/Texas/50/2012 szerű NYMC X-

223A reasszortáns törzs (min. 15 µg HA); B/Massachusetts/2/2012 vad típusú törzs (min. 15 µg HA) formalinnal inaktivált formáját (TIV), adjuvánsként pedig alumínium-foszfátot (Al) használtunk (National Institute of Pharmacy and Nutrition, Hungary, 2015). Az egerek immunizálásához az alumínium-foszfáttal adjuvált trivalens inaktivált vakcina (TIV+Al vagy Fluval AB) mellett kontrollként az adjuváns nélküli TIV-et (TIV), alumínium-foszfátot és Freund adjuvánsot tartalmazó TIV-et (TIV+Al+F), formalinnal inaktivált egerhez adaptált PR8 törzset (PR8), inaktivált és alumínium-foszfáttal adjuvált PR8 törzset (PR8+Al), valamint PBS-t tartalmazó vakcinákat alkalmaztunk.

A challenge fertőzésnél alkalmazott élő H1N1 A/Puerto Rico/8/34 vírust és a lépsejtek stimulálásához használt élő H1N1 A/California/07/2009 szerű NYMC X-179A reasszortáns törzset, az influenzavírus-törzskollekcióból a Nemzeti Influenza központ Referencia laborja (Országos Epidemiológiai Központ, Budapest) biztosította.

2.3. Aktív immunizáció és fertőzés

2.3.1. NMRI egerek immunizálása, immunsavó nyerése passzív immunizálás céljából, challenge fertőzés

Száznyolc NMRI egeret 6 csoportban (18 egér/csoport) i.m.-an oltottunk három alkalommal, az oltások között 3 hetes szünettel. A vakcinák összetétele alapján a következő csoportokat állítottunk össze:

1. TIV; 45 µg HA (vírustörzsenként 15 µg) tartalmú vakcina
2. TIV+Al; alumínium-foszfáttal adjuvált TIV-vakcina mely megfelel a Fluval AB-vakcinának
3. TIV+Al+F; Freund adjuvánsal kombinált TIV+Al-vakcina
4. PR8; inaktivált PR8 vírus vakcina, 15 µg HA tartalommal
5. PR8+Al; alumínium-foszfáttal adjuvált PR8-vakcina
6. PBS

Az utolsó oltás után 2 héttel, csoportonként 5 egértől altatást követően szívpunkcióval vért vettünk. A savókban meghatároztuk az egyedi egerek HAG-titerét a vakcinában található 3 vírustörzs ellen, majd a savók csoportonkénti összemérését követően a savókeverékek HAG-, NAG- és VN-titereit a reasszortáns A/California illetve a PR8 vírustörzs ellen. A csoportonként megmaradt 13 egeret elaltattuk, majd intranazálisan fertőztük élő PR8-vírussal. A fertőzést követő 6. napon csoportonként 3 egeret

elaltattunk és a tüdejükben meghatároztuk a vírusrészecskék mennyiségét. A csoportonként megmaradt 10 állatnál naponta súlyt mértünk, klinikai állapotukat pontszámokkal értékeltük.

2.3.2. NMRI egerek immunizálása, celluláris immunválasz

10 NMRI egeret háromszor oltottunk TIV+AI-vakcinával a 0., 4. és 8. héten. Pozitív kontroll nyerése céljából további 10 egeret a 0. és 4. héten TIV+AI-vakcinával, majd a 8. héten TIV+AI+F-tartalmú vakcinával immunizáltuk. Negatív kontrollként 6 egeret PBS-el oltottunk. A 9. héten az állatokat elaltattuk, a lépüket feldolgoztuk és áramlási citometriával vizsgáltuk.

2.3.3. Balb/c egerek immunizálása, immunsavó nyerése passzív immunizáció céljából, celluláris immunválasz

Balb/c egerek 3 csoportját az előbb felsorolt TIV+AI-, TIV+AI+F- és PBS-tartalmú vakcinákkal oltottuk 3 alkalommal, 3 hetes időközökkel. A 3. oltást követő 14. napon az egereket elvéreztettük, csoportonként savókeveréket készítettünk, majd a keverékek HAG-, NAG- és VN- titerét meghatároztuk és passzív immunizálási kísérletekhez használtuk. Az egerek lépét az IFN- γ - és granzyme-B-mRNS kifejeződés méréséhez használtuk.

2.4. Passzív immunizáció és challenge fertőzés

Az egerek aktív immunizálását követően keletkezett savókeverékeket használtuk passzív immunizációhoz. NMRI egerek esetében állatonként 300 μ l, Balb/c egerek esetében 100-200 μ l savót egészítettünk ki 500 μ l-re, PBS-el, majd intraperitoneális injekcióval kezeletlen, recipiens egerekbe juttattuk. A savó transzfert követően 24 óra múlva a recipiens egereket elaltattuk, a retroorbitális plexusból vért vettünk, majd intranazálisan fertőztük élő PR8-vírussal. A recipiens egerekből származó savók HAG-titerét meghatároztuk, majd összehasonlítottuk a donor savók titerével. A fertőzést követően az állatoknál 18 napon keresztül naponta súlyt mértünk, klinikai állapotukat pontszámokkal értékeltük.

2.5. Hemagglutináció gátlás, Neuraminidáz gátlás, Vírus neutralizáció

Az egérsavókban a vírus hemagglutinin ellen termelt antitestek mennyiségét a korábban leírt standard HAG-módszerrel vizsgáltuk, csirke vörösvérsejt szuszpenziót használva. A savók vírus neuraminidáz gátló titerét szintén már leírt módszerrel határoztuk meg. A savók vírusneutralizációs vizsgálatát MDCK-sejteket használva végeztük 96 lyukú

sejttenyésztő lemezen lyukanként 100 TCID₅₀ mennyiségű vírust használva. A vírusok méréséhez, csirke vörösvérsejt szuszpenziót használva a standard heagglutinációs vizsgálatot választottuk.

2.6. Vírusmennyiség meghatározása fertőzött egerek tüdejében

Az aktív immunizálásban részesített egereknél csoportonként 3 egér tüdejét kivettük a fertőzést követő 6. napon. A tüdők vírus tartalmát feldolgozást követően MDCK-sejt monolayeren vizsgáltuk. 72 órás inkubációt követően a sejttenyésztő lemezen a citopátiás elváltozást mutató lyukakat megszámláltuk, majd a vírusmennyiséget és a TCID₅₀ értéket meghatároztuk. A vírus titeret TCID₅₀/g tüdő értékben fejeztük ki.

2.7. Áramlási citometria

NMRI egereket háromszor oltottunk TIV+AI- vagy TIV+AI+F-tartalmú vakcinával, illetve negatív kontrollként PBS-el. Az utolsó oltást követő 7. napon kivettük az állatok lépét, feldolgoztuk és a lépsejt szuszpenziót 48 lyukú lemezre tettünk. Lyukanként 2×10^6 sejtet élő H1N1 A/California/07/2009 szerű NYMC X-179A reasszortáns törzsszel (2 MOI) stimuláltuk 24 órán keresztül. A stimulálás utolsó 12 órájára Brefeldin A-t (Beckton Dickinson, USA) adtunk a rendszerhez, 1 µg/ml végkoncentrációban a fehérje transzport gátlása céljából. A különböző sejtpopulációk azonosítására fluorokrómmal jelölt monoklonális ellenanyagokat használtunk, melyek a következők voltak: CD3-FITC, CD4-PerCP, CD8-PE, IFN γ -Alexa Fluor és Granzyme-B-eFluor (eBioscience, USA). FACS Calibur (Beckton Dickinson, USA) készülékkel 5000-10000 élő sejtet leszámolva CELLQuest pro software segítségével határoztuk meg a pozitív sejtek arányát.

2.8. IFN- γ - és granzyme-B-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel

Oltott (TIV+AI vagy TIV+AI+F vagy PBS) Balb/c egerekből a harmadik oltás után 14 nappal kivettük a lépét, majd az előző fejezetben (2.7.) leírtak szerint a lépsejt szuszpenziót stimuláltuk, Brefeldin A nélkül. A qRT-PCR kivitelezése a korábban (1.4.3.) leírtak szerint történt, kisebb módosításokkal. Az mRNS-ek átírása cDNS formába RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, UK) alkalmazásával történt. A PCR során az IFN- γ , granzyme-B, valamint a peptidylprolyl isomerase (PPIA) háztartási gén cDNS-ek adott szakaszát kódoló nukleotid szekvenciákat használtuk. Az adott IFN- γ - és granzyme-B-mRNS-kifejeződésének

emelkedését az immunizált állatból származó mintákban a PBS-tartalmú vakcinával immunizált állatból származó mintához képest adtuk meg.

2.9. Statisztikai elemzések

Minden statisztikai számítást a Microsoft Excel 2007 rendszerrel végeztünk. A testsúly és a klinikai pontszám esetében is az egyes megfigyelési napokon kapott értékekből görbe alatti területet (AUC) számoltunk, majd a kapott AUC értékeket minden egyes állatnál összegeztük és a statisztikai számításnál ezekkel az összegzett AUC értékekkel kalkuláltunk. A fertőzést követően elhullott állatoknál az utolsó értéket tovább vittük a megfigyelési idő végéig, így számolva ezekben az esetekben az összegzett AUC-t. Az eredmények közötti eltérések, szignifikanciák számolásához Mann-Whitney tesztet használtunk, a korrelációs koefficiens meghatározásához Pearson tesztet.

Eredmények

1. VZV-vakcináció immunológiai hatása intradermális alkalmazás esetén

1.1. VZV-DNS tartalom változása tengerimalac bőrbopszia mintákban, az intradermális oltást követően

Az i.d.-oltáshoz használt készülék megbízhatóságának megállapítására tengerimalacok két csoportját oltottuk i.d.-an és vizsgáltuk a VZV-DNS bőrben történő kimutathatóságát az oltást követő különböző időpontokban. Az egyik csoportot az élő gyengített, a másik csoportot az inaktivált 399-PFU vírust tartalmazó VZV-vakcinával oltottuk, majd bőrbopszia mintákat vettünk azonnal az oltás után (0. nap), valamint a 2., 4., 7. és 14. napokon.

A közvetlenül az oltás után vett bőrmintákban a VZV-DNS és RNázP referencia gén DNS-mennyisége hasonló volt, függetlenül attól, hogy élő-, vagy inaktivált vírussal voltak-e oltva az állatok.

Az oltást követően minden választott időpontban 2-3 tengerimalac bőrmintájának feldolgozása után megállapítottuk, hogy a VZV-DNS tartalom idővel csökkent a mintákban. A 4. és 7. napon a VZV-DNS mennyisége magasabb volt az élő vírussal oltott állatok mintáiban az inaktivált vírussal oltottakéhoz képest, azonban ez a különbség nem volt szignifikáns ($p > 0,05$).

1.2. IFN- γ -, granzyme-B- és perforin-mRNS-kifejeződés változása tengerimalac lépsejtekből 399-PFU-dózisú élő vagy inaktivált VZV-tartalmú oltóanyaggal történt

vakcinációt követően és az ismételt oltás hatása 399-PFU-dózisú inaktivált VZV-vakcina esetében

IFN- γ -, granzyme-B- és perforin-mRNS-kifejeződés szempontjából nem találtunk különbséget a 399-PFU-dózisú élő vagy hasonló dózisú inaktivált vakcinák illetve i.d.- vagy s.c.-oltási módok között, azonban az inaktivált vakcina ismételt i.d.-oltása szignifikánsan ($p=0,004$) megemelte az IFN- γ -mRNS-kifejeződést az oltatlan állatok eredményéhez képest. Granzyme-B és perforin esetében az ismételt oltás sem emelte meg szignifikánsan az mRNS-kifejeződést az oltatlan állatok eredményeivel összehasonlítva.

1.3. IFN- γ -, granzyme-B- és perforin-mRNS-kifejeződés változása *in vitro* tengerimalac lépsejtekből 1995-PFU-dózisú élő vagy hővel inaktivált VZV-vírustartalmú vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt oltást követően

A 399-PFU-dózis alkalmazásától eltérően az 1995-PFU-dózisú vakcina használata után az IFN- γ -mRNS-kifejeződés minden oltott csoportban szignifikánsan magasabb volt, az oltatlan állatokhoz viszonyítva, azonban a szignifikancia foka erősebb volt az i.d.-oltottaknál ($p<0,005$), mint az s.c.-oltottak ($p<0,05$) csoportjánál. Az élő vakcina mindkét (i.d., s.c.) esetben magasabb IFN- γ -választ eredményezett, mint az inaktivált vakcina, de ez a különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. Fontos megfigyelés, hogy az inaktivált vakcinával i.d.-módon oltott állatoknál szignifikánsan magasabb IFN- γ -mRNS-kifejeződést értünk el, mint s.c.-úton oltottaknál ($p=0,025$).

A granzyme-B-mRNS-kifejeződés az oltatlan állatoknál kapott értékekhez képest csak az i.d.-immunizált állatoknál volt szignifikánsan magasabb ($p<0,005$), a s.c.-oltott tengerimalacok esetében nem. Hasonlóan az IFN- γ -eredményhez, az inaktivált vírus tartalmú oltóanyag esetében a granzyme-B-mRNS-kifejeződés szignifikánsan magasabb volt az i.d.-vakcinációs útnál az s.c.-úthoz képest ($p=0,004$).

A perforin-mRNS-kifejeződés csak az inaktivált oltóanyaggal i.d.-módon oltott állatoknál volt szignifikánsan magasabb ($p<0,005$), mint a nem immunizált állatoknál.

1.4. IFN- γ -fehérje koncentráció mérése *in vitro* stimulált tengerimalac lépsejtekből, 1995-PFU-dózisú élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt oltást követően, korreláció az IFN- γ -mRNS-kifejeződés és IFN- γ -fehérje szint között

Ahogy az mRNA-kifejeződés esetében, úgy a fehérje termelődés is szignifikánsan magasabb volt minden oltott csoportban, az oltatlanhoz képest ($p < 0,05$). A hővel inaktivált i.d.-immunizált csoportnál szignifikánsan magasabb volt az IFN- γ -mRNA-kifejeződés a s.c.-oltottakhoz képest, azonban fehérje esetében - bár szintén magasabb értékeket kaptunk- a különbség nem volt szignifikáns. Az IFN- γ -mRNA illetve fehérje reaktív állatokat összehasonlítva, a korrelációs koefficiens értéke 0,88 volt.

1.5. VZV-glikoprotein-specifikus és vírus-neutralizáló ellenanyag szint változása, élő vagy hővel inaktivált VZV-vakcinával intradermális vagy szubkután módon történt immunizálást követően

Az 1995-PFU-dózissal immunizált állatok által termelt VZV-glikoprotein-specifikus ellenanyag titerek között nem volt szignifikáns különbség, még a legmagasabb értéket elért élő vakcinával s.c.-immunizált állatok eredményeihez viszonyítva sem. A hővel inaktivált vakcina i.d.-oltva magasabb ellenanyagszintet eredményezett 399- és 1995-PFU-dózis esetében is, mint s.c.-oltva, de ez a különbség egyik dózis esetében sem bizonyult szignifikánsnak. Az 1995-PFU-dózist tartalmazó hővel inaktivált vakcina i.d.-módon adva szignifikánsan magasabb ellenanyagszintet eredményezett, mint ugyanezen vakcina egyszeri ($p < 0,005$) illetve kétszeri 399-PFU-dózisa ($p < 0,05$). Kétszer i.d.-oltott 399-PFU-dózisú hővel inaktivált vakcina szignifikánsan magasabb ellenanyag szintet hozott létre az egyszeri oltáshoz képest ($p < 0,005$). Az 1995-PFU-dózissal immunizált állatok által termelt neutralizáló ellenanyagok között – hasonlóan a VZV-glikoprotein-specifikus ellenanyagokhoz - nem volt szignifikáns különbség. A 399-PFU-dózissal immunizált állatoknál nem volt mérhető neutralizáló ellenanyagszint, azonban ugyanez a dózisú hővel inaktivált vakcina kétszer oltva már 1:32-es titert eredményezett.

2. Influenza vakcináció védőhatása a hemagglutinin és neuraminidáz szempontjából heterológ vírustörzssel szemben

2.1. TIV+A1-vakcina (Fluval AB) védő hatása NMRI egerekben, egérhez adaptált PR8-vírus letális dózisával szemben

A PBS-el oltott állatok mind elpusztultak 10 napon belül a PR8-fertőzést követően. Az összes többi állat, függetlenül a vakcina összetételétől, túlélte a fertőzést. Ezen állatoknál az alacsony morbiditást jelzi, hogy a testsúlyváltozás 7%-on belül volt, szignifikáns különbség nélkül ($p > 0,05$), valamint a klinikai pontszámok nem emelkedtek 0 fölé a PR8-vírustörzssel történt fertőzést követően. Azonban mind a

testsúlyváltozásnál, mind pedig a klinikai pontszámok esetében szignifikáns különbség volt a PBS- és a különböző vakcinákkal immunizált állatok között ($p < 0,01$).

A fertőzést követő 6. napon eltávolított tüdő mintákban a PR8 tartalmú vakcinákkal immunizált egerek esetében nem volt detektálható fertőző vírus. A TIV-, TIV+Al- és TIV+Al+F-immunizált egerek tüdejében hasonló volt a fertőző vírus partikulák mennyisége, statisztikai különbség nélkül ($p > 0,05$). A PBS-el oltott egerek tüdejében ez az érték szignifikánsan magasabb volt a különböző TIV-tartalmú vakcinákkal immunizált állatok eredményeihez viszonyítva ($p < 0,05$).

2.2. TIV+Al- (Fluval AB) vakcinával oltott egerek savójának védőhatása a PR8-vírus letális dóziséval történt fertőzéssel szemben

Aktív immunizálásban részesült NMRI és Balb/c egerek savóit oltottuk i.p.-módon NMRI (300 μ l savó/egér) és Balb/c (100 – 200 μ l savó/egér) naiv recipiens (r) egerekbe, majd fertőztük az állatokat a PR8 törzs letális dóziséval.

A letális dóziséval PR8-vírussal történt fertőzés után 100%-ban életben maradtak az (r)PR8, (r)PR8+Al, (r)TIV+Al+F ($p < 0,01$), 80%-ban az (r)TIV+Al ($p < 0,05$) és 20%-ban az (r)TIV ($p = 0,174$) NMRI egerek. Az (r)PBS NMRI egerek mind elpusztultak. Az (r)TIV egereknél a túlélés szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az (r)TIV+Al ($p = 0,047$) egereknél. A Balb/c csoportban 100%-ban túléltek a PR8-fertőzést a 100 vagy 200 μ l savót kapott (r)TIV+Al+F és a 200 μ l savót kapott (r)TIV+Al egerek. A 100 μ l savót kapott (r)TIV+Al Balb/c egerek esetében ez a védelem csak 50%-os volt ($p = 0,021$), az (r)PBS egerekhez viszonyítva ($p < 0,01$). A 100 vagy 200 μ l savót kapott (r)TIV+Al Balb/c egerek között a túlélés szignifikánsan különbözött ($p = 0,025$).

A betegség súlyosságát jelző testsúly csökkenés szignifikánsan alacsonyabb volt az (r)PR8, (r)PR8+Al, (r)TIV+Al+F ($p = 0,009$), valamint az (r)TIV+Al ($p = 0,028$) NMRI egereknél, az (r)PBS egerekhez viszonyítva. Az (r)TIV állatok esetében a testsúlycsökkenés megközelítette az (r)PBS egerekét ($p = 0,117$), valamint szignifikánsan súlyosabb volt, mint az (r)TIV+Al egereknél mért értékek ($p = 0,047$).

A Balb/c egereknél mért testsúly csökkenés a 100 vagy 200 μ l savóval oltott (r)TIV+Al+F, valamint a 200 μ l savóval oltott (r)TIV+Al egereknél szignifikánsan kisebb volt, mint az (r)PBS egerek testsúlycsökkenése ($p = 0,0017$). Hasonlóan a túlélési eredményekhez, a 100 μ l savóval oltott (r)TIV+Al Balb/c egerek esetében a testsúly

csökkenés is megközelítette az (r)PBS egereknél mértéket és szignifikánsan magasabb volt, mint a 200 µl savóval oltott (r)TIV+AI egerek esetében ($p=0,035$).

A klinikai pontszámok a 0- vagy 100 %-os védettséget elért NMRI és Balb/c egereknél hasonlóan alakultak. A túlélési és testsúlycsökkenési eredményekhez hasonlóan, a klinikai pontszámok tekintetében is szignifikáns a különbség az (r)TIV és (r)TIV+AI csoportok között ($p=0,028$) NMRI egerek esetében. A 200 µl savóval oltott (r)TIV+AI Balb/c egereknél a pontszámok medián értéke a 10. nap után 0-ra csökkent, azonban a 100 µl savóval oltott (r)TIV+AI Balb/c egereknél ez az érték a megfigyelési periódus végéig 2 maradt, széles interkvartilis tartománnyal. Ez a csoporton belüli nagy eltérés jelzi, hogy a 100 µl savóval oltott (r)TIV+AI Balb/c egereknél nagyobb számú állat érte el a magas klinikai pontszámot.

2.3. A hemagglutináció gátló-, neuraminidáz gátló- és vírusneutralizáló-aktivitástól független savó komponensek védő hatása

A passzív immunizációs kísérlet során tapasztalt védőhatás mechanizmusának vizsgálata céljából, a transzferhez használt savókat megvizsgáltuk HAG-, NAG- és VN-tesztekkel. Nem találtunk keresztreakciót az A/PR/8/34 (H1N1) és az A/California/7/2009 (H1N1) szerű reasszortáns influenzavírus törzsek között HAG-teszttel, de ugyanerre az eredményre jutottunk NAG- és VN-tesztekkel is.

24 órával a savó transzfer után a recipiens egerektől vett mintákban is megmértük a HAG ellenanyag szintet. Az NMRI recipiens egerekben 16-21x, a Balb/c recipiens egerekben 8-32x alacsonyabb volt a HAG-titer, mint a donor savó keverékben. Azokban a recipiens egerekben, ahol magas volt az A/California reasszortáns vakcina törzs elleni HAG ellenanyag szint (egyedi NMRI recipiens egerek geometriai átlag titere: 126-253; Balb/c recipiens egerek savó pool titere: 160-320), ott az egerek 80-100%-a túlélte a fertőzést, annak ellenére, hogy a PR8-törzs elleni HAG-ellenanyag nem volt kimutatható az egerekben. A recipiens NMRI és Balb/c egerek eredményeit együttesen vizsgálva, a korrelációs koefficiens a védettség és HAG-titer esetében 0,77; testsúlycsökkenés és HAG-titer esetében pedig 0,71. Ez a pozitív korreláció azt sugallja, hogy a homológ törzs elleni magas HAG-titer bizonyos fokú védelmet jelez egy heterológ vírussal történő fertőzés esetén, de a HAG-ellenanyagok nem játszanak szerepet a vírus elleni védekezésben.

2.4. IFN- γ és granzyme-B termelődés mérése áramlási citometriás módszerrel, TIV+Al- (Fluval AB), valamint kontrollként TIV+Al+F- vagy PBS-tartalmú vakcinával immunizált NMRI egerek *in vitro* stimulált lépsejtjeiben

A TIV+Al-immunizáció szignifikánsan megemelte ($p < 0,05$) az IFN- γ -termelő sejtek százalékát a CD3⁺/CD4⁻-, CD3⁺/CD8⁻- és CD3⁻/CD8⁺-populációkban, valamint a granzyme-B-termelő sejtek százalékát a CD3⁺/CD4⁺-populációban, a PBS-el immunizált egerek mintáihoz képest. A TIV+Al+F-immunizált egereknél minden sejtpopulációban szignifikánsan magasabb volt ($p < 0,005$) az IFN- γ illetve granzyme-B termelő sejtek százaléka a PBS-el immunizált egerek mintáihoz képest.

2.5. IFN- γ - és granzyme-B-mRNS-kifejeződés mérése qRT-PCR-módszerrel, TIV+Al- (Fluval AB), valamint kontrollként TIV+Al+F- vagy PBS-tartalmú vakcinával immunizált Balb/c egerek *in vitro* stimulált lépsejtjeiben

Az IFN- γ - és granzyme-B-mRNS-kifejeződés is szignifikánsan megemelkedett a TIV+Al- és a kontrollként használt TIV+Al+F-immunizált egerek lépsejtjeiben is ($p < 0,05$). Szignifikáns különbség a TIV+Al- és a TIV+Al+F-eredmények között sem az IFN- γ sem a granzyme-B esetében nem volt ($p > 0,05$).

Következtetések

1. Alacsony dózisu (399-PFU) inaktivált VZV-vakcina i.d.-oltásával erősebb sejtes és humorális immunválasz érhető el tengeri malacban, mint s.c.-oltással, de a különbség nem szignifikáns.
Teljes dózisu (1995-PFU) inaktivált VZV-vakcina i.d.-oltásával szignifikánsan jobb sejtes immunválasz válasz érhető el tengeri malacban, mint s.c.-oltással. A humorális immunválasz is erősebb az i.d.-oltás esetében, de a különbség itt nem szignifikáns.
2. A Fluval AB-vakcina alkalmazását követően egerben az influenza megbetegedés elleni humorális védelem elérhető az elsődleges fontosságúnak tartott vírus epitópok elleni antitestek (HAG, NAG, VN) hiányában is, azonban a protektív ellenanyag szint eléréséhez szükséges az alumínium adjuváns jelenléte a vakcinában.
3. A Fluval AB-vakcina vírusspecifikus sejtes immunválaszt is kivált.

Saját közlemények bibliográfiai adatai

Az értekezésben felhasznált közlemények

Sarkadi J, Jankovics M, Fodor K, Kis Z, Takacs, Visontai I, Jankovics I, Gonczol E. (2015). High-level cellular and humoral immune responses in guinea pigs immunized intradermally with a heat-inactivated varicella-zoster virus vaccine. Clin Vaccine Immunol 22:570-577. **IF.: 2.3**

Sarkadi J, Kuti D, Jankovics M, Pallinger E, Fodor K, Kis Z, Gonczol E, Visontai I, Jankovics I. (2017). Protection by humoral elements independent of virus neutralization activity against an influenza virus challenge. New Microbiologica Közlésre elfogadva. **IF.: 1.629**

Egyéb közlemények az értekezés tárgykörében

Sarkadi J, Jankovics M, Kis Z, Skare J, Fodor K, Gonczol E, Visontai I, Vajo Z, Jankovics I. (2013). Protection of Chinese painted quails (*Coturnix chinensis*) against a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus strain after vaccination. Arch Virol. 158(12):2577-81. **IF.: 2.282**

Sarkadi J. (2013). Varicella-zoster virus vaccine, successes and difficulties. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 60 (4), pp. 379–396. **IF.: 0.78**

van Els C, Mjaaland S, Næss L, Sarkadi J, Gonczol E, Smith Korsholm K, Hansen J, de Jonge J, Kersten G, Warner J, Semper A, Kruiswijk C, Oftung F. (2014). Fast vaccine design and development based on correlates of protection (COPs). Human Vaccines & Immunotherapeutics 10:1935-1948. **IF.: 2.131**

Közlemények az értekezés tárgykörén kívül

Rókus László, Jankovics István, Jankovics Máté, Sarkadi Júlia, Visontai Ildikó. (2013). Miért aktuális 2013-ban a Severe Acute Respiratory Coronavirus fertőzés 2005-ben Magyarországon igazolt esete? Orvosi hetilap 154. évfolyam, 47. szám, 1877–1882.